

BÁRBARA OTHERO NUNES MUGNAINI

**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E ESTABILIDADE NA ÁGUA DO
ALIMENTO PARA PEIXES MICROENCAPSULADO EM ALGINATO
DE SÓDIO**

Orientador: Evoy Zaniboni Filho
Co-orientador: Giuliano Maia Huergo

Florianópolis, Novembro de 2013.

OTHERO, B.N.M.

Características físicas e estabilidade na água do alimento para peixes microencapsulado em alginato de sódio

Florianópolis, SC, 2013.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Aquicultura)

29p.

1.microencapsulado;2. Alginato; 3. gelificação interna. 4. larva de peixe

BÁRBARA OTHERO NUNES MUGNAINI

**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E ESTABILIDADE NA ÁGUA DO
ALIMENTO PARA PEIXES MICROENCAPSULADO EM ALGINATO
DE SÓDIO**

Professor Dr. Evoy Zaniboni Filho

Banca Examinadora:

Dra. Samara Hermes Silva

Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce

Túlio Barbosa Arantes

Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma maneira participaram deste ciclo na minha vida.

Em especial aos meus pais: Marco e Mônica. Por me permitirem caminhar e vivenciar as alegrias, viagens e experiências dessa bela juventude. Por pedirem sempre, que continuemos apenas naquilo que nos faça bem, sem julgar nossas escolhas. Pela paciência, amor incondicional e dedicação por nós três. Marcão, você me ensinou a ter emoção nas coisas bonitas dessa vida. Mamãe, você me ensinou a ser colorida.

Minhas irmãs: Mayra, na sua autenticidade e Mariana com todo seu charme. Cada uma com a sua personalidade, são partes opostas de mim. Amor por vocês!

A querida Maria do Carmo, que me ensinou valores para a vida inteira. Gratidão pela dedicação e amor incondicional por nós.

Ao professor Evoy, pela oportunidade de estágio no laboratório. Foi uma ótima experiência no curso!

Ao Giuliano, por direcionar meu trabalho, me ensinar naquilo que deveria ser feito. Gostei muito de trabalhar com as nossas “bolinhas”! Sou muito grata a ti!

Aos colegas de laboratório, Fernando, Jonatas, Jade, Maurício, Rafael, Ronaldo, Renata, Rossano e Samara, obrigada pela ajuda em algum momento durante esse semestre.

E em especial: a Mari (pela calma transmitida só com um sorriso, sempre tão sereno! Obrigada por me incentivar a vir até o Lapad!) e Túlio (pele “mineirice” pronta em ajudar!).

A nossa querida Jussara, sempre “quebrando nosso galho” nos assuntos mais burocráticos com seu cotidiano bom humor!

As amigas construídas durante esse tempo de curso, cada um de vocês deixou comigo um novo aprendizado e vivência.

Em especial ao meu trio: Ana, Amábil e Gi! Ana, que bom que a vida muda! Mah, sorrisos e sorrisos sempre! Gi, te admiro muito! Seus conselhos me fizeram crescer.

Aos cacos: Douglas (“Sente a energia do Farol!” Gosto muito de ti!); Caio (obrigada por me ajudar a manter a calma nessa etapa. “bora, djow!”); Chico (meu amigo, que a amizade sempre permaneça!); Ique (tu faz falta aqui!); Evandro, Tim, Skeeter (tartarodonte, leva essa sua alegria pro mundo, meu querido!) A todos vocês, minha gratidão pela ajuda (às vezes não) nos trabalhos e, claro, pela fanfarra e boas risadas! E colegas: Lucas, George, Marcelo, obrigada pela competência ao fazermos um trabalho juntos.

Torço por todos vocês!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento da tecnologia de cultivo de peixes nativos na fase de larvicultura, através da produção de um microencapsulado de coração de frango pelo método de gelificação interna com alginato. A partir da produção de uma pasta de coração de frango, foram realizados ensaios para testar diferentes tempos de rotação – 15 e 10 minutos – e as características das microcápsulas formadas. No ensaio 1 foram produzidas microcápsulas de menor área quando comparada ao ensaio 2, mostrando que maiores tempos de rotação, resultam em menores partículas formadas. Foi realizado um experimento para avaliar a estabilidade das partículas da água, sendo adicionado 5g de microencapsulado (MC) por unidade experimental e um tratamento (CO) que não recebeu microencapsulado. A qualidade da água foi semelhante entre os tratamentos, exceto pela gradativa elevação da condutividade da água ($p < 0,05$) nos tratamentos que receberam o microencapsulado, indicando gradativa dissolução da proteção de alginato, sendo mais evidente a partir do terceiro dia de exposição a água. A aplicação desta metodologia, apresentou potencial para o uso no fornecimento do primeiro alimento de larvas.

Palavras-chave: microencapsulado; alginato; gelificação interna; larva de peixe.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização do LAPAD e vista externa das edificações.

Figura 2. Laminaria sp.

Figura 3. Estruturas dos blocos constituintes de alginato: (a) Ácido L-gulurônico, (b) Ácido D-manurônico, (c) unidades de ácido D-manurônico alternadas com unidades de ácido L-gulurônico.

Figura 4. Interação específica do cálcio com caixas de blocos de ácido gulurônico. Os círculos pretos representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação do íon cálcio.

Figura 5: Processador de alimentos, ao final do preparo. A camada mais clara, é o óleo, a segunda, a água e no fundo, as partículas formadas.

Figura 6: A - microencapsulado menor; B - microencapsulado maior.

Figura 7: Imagens dos microencapsulados tratadas. A – imagem original; B – aplicação de oito bits e preto e branco no Image J; C – esferas que estavam juntas foram apagadas no programa GIMP

Figura 8. Distribuição de frequência da área das microcápsulas para o ensaio 1 e 2.

Figura 9. Dispersão entre área e Esfericidade das microcápsulas do Ensaio 1.

Figura 10. Dispersão entre área e Esfericidade das microcápsulas do Ensaio 2.

Figura 11. Regressões lineares entre os dias de experimento e os valores de condutividade para ambos os tratamentos.

Figura 12. Aspecto das microcápsulas ao longo do experimento. A, B e C correspondem ao primeiro, terceiro e último dia de experimento respectivamente.

Figura 13. Larva de suruvi, com o trato digestivo cheio de microcápsulas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores mínimos e máximos, média, desvio padrão, moda, mediana e coeficiente de variação da área e esfericidade das microcápsulas para os ensaios 1 e 2.

Tabela 2. Médias e respectivos erro padrões para condutividade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido dos dois tratamentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

g – grama

ml – miligrama

t – tonelada

μl – microlitro

μm – micromêtro

μm² – micromêtro quadrado

DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) da Universidade Federal de Santa Catarina, (Figura 1) no período de agosto de 2013 a novembro deste mesmo ano, durante o estágio supervisionado II do curso de Graduação de Engenharia de Aquicultura.

O laboratório está localizado no sul da ilha de Santa Catarina, próximo a sede do Parque Municipal da Lagoa do Peri. Tem como professores responsáveis Evoy Zaniboni Filho, orientador deste trabalho e os professores Alex Pires de Oliveira Nuñez, Débora Machado Fracalossi e Anita Rademaker Valença. Como principais atividades, desenvolve há quase uma década estudos voltados para o monitoramento e manejo da ictiofauna em usinas hidrelétricas na região do alto Rio Uruguai e cultivo de peixes nativos na mesma região.



Figura 1. Localização do LAPAD e vista externa das edificações. Fonte: <http://www.lapad.ufsc.br/>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 PANORAMA ATUAL DA PISCICULTURA	11
1.2 PRIMEIRO ALIMENTO NA LARVICULTURA	12
1.3 ALGINATO	12
1.4 GELIFICAÇÃO INTERNA	15
2 OBJETIVOS	15
2.1 GERAL	15
2.2 ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 PRODUÇÃO DA PASTA DE CORAÇÃO DE FRANGO	16
3.2 PREPARAÇÃO DO MICROENCAPSULADO	16
3.3 ANÁLISE FÍSICA DAS MICROCÁPSULAS	18
3.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MICROENCAPSULADO EM ÁGUA	19
3.5 TESTE DE ACEITABILIDADE DAS MICROCÁPSULAS PELAS LARVAS	19
4 RESULTADOS	20
4.1 ANÁLISE FÍSICA DAS MICROCÁPSULAS	20
4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MICROENCAPSULADO EM ÁGUA	12
4.3 TESTE DE ACEITABILIDADE DAS MICROCÁPSULAS PELAS LARVAS	13
5 DISCUSSÃO	14
5.1 ANÁLISE FÍSICA DAS MICROCÁPSULAS	14
5.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MICROENCAPSULADO EM ÁGUA	15
.....	15
6 CONCLUSÃO.....	15
7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	16

1 INTRODUÇÃO

1.1 PANORAMA ATUAL DA PISCICULTURA

A atividade aquícola tem crescido nos últimos anos devido ao aumento da procura por proteína de qualidade. Segundo a FAO (2012), a piscicultura continental, obteve uma produção de aproximadamente 60 milhões de toneladas em 2010, superando o ano anterior em 7,5%.

No Brasil a produção no ano de 2011 foi de 628.704,3 t, 31,1% maior em relação ao ano anterior. Entre os anos de 2009-2011, houve um incremento de 51,2% na produção, evidenciando o crescimento deste setor. Merece destaque a piscicultura continental, responsável por 86,6% do total nacional e que entre os anos de 2010 a 2011 cresceu 38% (MPA, 2013).

A Região Sul, no ano de 2011, apresentou uma produção de 153,674,5 t, a maior do país (28,2%) – o estado do Paraná é o maior produtor, com 73.831,1 t, Santa Catarina agrega com 53.641,8 t. O Nordeste somou com 134.292,6 t (24,7%) para a piscicultura continental, seguida pelas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste com 17,4%, 15,9% e 13,8%, respectivamente.

O avanço do setor contribui com a geração de emprego e incremento da renda de algumas populações, principalmente, naquelas com poucas opções de desenvolvimento econômico. A aquicultura é promissora para a manutenção do homem no campo, podendo até substituir atividades econômicas depredatórias como a extração de madeira ilegal na região amazônica. Além disso a piscicultura, pode ser vista como uma alternativa para a atividade agropecuária em localidades com agricultura familiar (MPA, 2011).

Dentre as espécies cultivadas na aquicultura continental, segundo o último Boletim publicado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura em 2011, a tilápia e o tambaqui, são as mais cultivadas, somadas representam 67% do total. Espécies nativas como o Suruvi, ainda não apresentam, valores expressivos no ranking nacional. Mas se apresenta como espécie promissora para o cultivo em tanque-rede e tem se mostrado dócil, resistente ao manejo, boa tolerância a altas densidades, além de boas taxas de sobrevivência (CAVALCANTE, 2010).

1.2 PRIMEIRO ALIMENTO NA LARVICULTURA

Um entrave para a larvicultura de espécies nativas está relacionado à primeira alimentação (LUZ & ZANIBONI-FILHO, 2001). O alimento, tem influência direta sobre o desempenho, sobrevivência e crescimento dos peixes, uma deficiência nessa etapa, causa alta mortalidade nas fases iniciais (DIEMER, 2012). Entretanto, a imaturidade do sistema digestório de peixes, devido à ausência de enzimas, dificulta a utilização de microdietas como primeiro alimento (KUBITZA, 1997; PORTELLA & DABROWSKI, 2008). O uso de alimento vivo é comum e amplamente utilizado na criação de peixes. No entanto, a utilização de náuplios de *Artemia*, aumenta o custo da produção (ADAMANTE, 2007). Uma dieta formulada, capaz de suprir as necessidades de crescimento e desenvolvimento das larvas de peixes na primeira alimentação, busca reduzir ao mínimo o uso desse alimento vivo (YÚFERA, 2005).

Segundo Menossi et. al. (2012), o alimento inerte deve ser atrativo, palatável, apresentar densidade adequada, estabilidade na água, e estar nutricionalmente balanceado. Contudo, segundo este autor, devido ao reduzido tamanho das partículas muitos nutrientes são lixiviados no contato com a água. Buscando solucionar este problema, a indústria aquícola procura novas tecnologias para a produção de microdietas mais estáveis e nesse contexto, chama a atenção o processo de microencapsulação (YÚFERA, 2005; MENOSSI, 2012).

A microencapsulação pode ser obtida através da gelificação interna com alginato, a qual resulta em partículas mais adequadas ao uso em aquicultura, por se tratar de uma técnica de baixo custo e sem o uso de solventes tóxicos (Poncelet et. al. 1992; Yúfera et. al. 2005).

As microesferas de alginato atuam como matrizes transportadoras biológicas, uma tecnologia simples, que vem sendo utilizada em diversos ramos de pesquisas industriais (SILVA, 2003). Para a aquicultura, as partículas de alginato não apresentam nenhuma restrição para larvas de peixe (YÚFERA, 2005).

1.3 ALGINATO

Alginatos são hidrocolóides com alto potencial de uso para a biotecnologia. Estão presentes em todas as algas pardas da classe *Phaeophyceae*, onde possuem função estrutural

nas paredes celulares, conferindo flexibilidade e resistência mecânica, fundamentais ao seu crescimento no mar (SANTOS, 2012). Elas dominam costões rochosos em muitas regiões frias do mundo, podendo ocorrer desde formas microscópicas até os enormes kelps, da ordem Laminariales (BRESSEL, 2007).

A produção industrial extrai esse composto principalmente de espécies dos gêneros *Laminaria* (Figura 2) e *Ascophyllum*, mas espécies de gêneros como *Lessonia*, *Durvillea* e *Macrocystis* também possuem o composto, sendo as algas de águas mais frias responsáveis pela produção de um alginato com melhor qualidade (FAO, 2002). São amplamente utilizados na indústria alimentícia em virtude de sua alta capacidade em reter água, propriedades gelificantes, estabilizantes e capacidade de modificar a viscosidade de meios aquosos (SANTOS, 2012).



Figura 2. *Laminaria* sp. Fonte: http://brphycsoc.org/descriptions/laminaria_digitata.html

Quanto à sua composição molecular, o alginato é um polissacarídeo linear, constituído por unidades monoméricas: o ácido β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-gulurônico (G) (Figura 3), ligados por ligações glicosídicas do tipo 1 \rightarrow 4 (BRESSEL, 2007; SANTOS, 2012). A forma como esses blocos se apresenta afeta as ligações glicosídicas entre os carbonos C-1 e C-4 e, juntamente com o comprimento, distribuição e proporção, as propriedades físicas e químicas da molécula de alginato são determinadas.

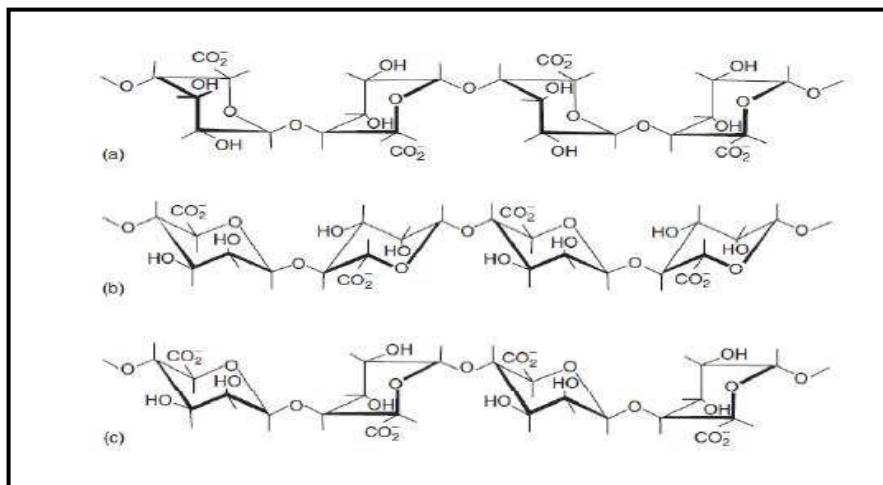


Figura 3. Estruturas dos blocos constituintes de alginato: (a) Ácido L-gulurônico, (b) Ácido D-manurônico, (c) unidades de ácido D-manurônico alternadas com unidades de ácido L-gulurônico. Fonte: SANTOS, 2012

Uma de suas propriedades mais importantes é a capacidade de formar géis na presença de cátions adequados. Para a formação de um gel, o alginato deve apresentar em sua estrutura números suficientes de monômeros gulurônicos e estas unidades devem estar em série. São essas unidades que reagem com o cálcio, acomodando no interior de suas cadeias de blocos G este íon, gerando uma estrutura conhecida como egg-box, proposto por Grant em 1973 (Figura 4) (BRESSEL, 2007).

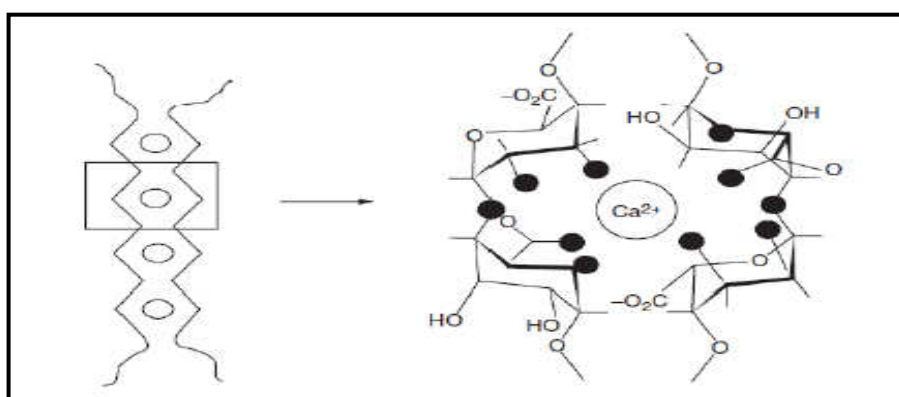


Figura 4. Interação específica do cálcio com caixas de blocos de ácido gulurônico. Os círculos pretos representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação do íon cálcio. Fonte: SANTOS, 2012.

Em síntese, o mecanismo de formação do gel baseia-se nas reações intra e intermoleculares do cátion cálcio com as moléculas de alginato, nas quais são formadas

ligações cruzadas entre os grupos carboxila e os íons de cálcio, que também interagem com os átomos de oxigênio presentes nos grupos hidroxilas (SANTOS, 2012).

1.4 GELIFICAÇÃO INTERNA

O processo de gelificação interna consiste na liberação de íons de cálcio em uma solução de um polissacarídeo iônico – o alginato – no interior do sistema através da quebra espontânea de gluconolactona (PONCELET, 1992; URBANO, 2004). O cálcio é melhor e mais rapidamente disponibilizado para as moléculas de alginato com níveis de pH mais ácidos (PONCELET, 1992; URBANO, 2004; YÚFERA, 2005; SANTOS 2012). O citrato de cálcio controla a reação competindo com as moléculas de alginato pelos íons de cálcio livres, evitando a pré-gelificação do alginato durante o tempo de mistura do produto (SANTOS, 2012). A adição de ácido acético, com a fase oleosa, acelera a solubilidade dos sais de cálcio.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Contribuir para desenvolvimento da tecnologia de cultivo de peixes nativos na fase de larvicultura.

2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir um microencapsulado de coração de frango a partir do processo de gelificação interna com alginato;
- Avaliar as características físicas das microcápsulas formadas;
- Avaliar a estabilidade das microcápsulas na água.

- Testar a aceitabilidade do microencapsulado como primeiro alimento em larvas de suruvi (*Steindachneridion scriptum*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DA PASTA DE CORAÇÃO DE FRANGO

Como fonte proteica foi utilizada o coração de frango cru. Foi preparada uma pasta do coração de frango a partir de 500 gramas (g) da carne previamente limpa de gordura, a qual foi triturada em um processador de alimentos durante 10 minutos com a adição de uma pequena quantidade de água. A pasta obtida foi peneirada em malha de 500 μm e em seguida em malha de 120 μm para utilização na produção do microencapsulado.

3.2 PREPARAÇÃO DO MICROENCAPSULADO

Os microencapsulados foram obtidos a partir da adaptação dos protocolos descritos por Poncelet et al. (1992) e Yúfera et al. (2005). Uma mistura (M1) contendo 40 g de solução de alginato de sódio (1,5 %), 40 g de pasta de coração de frango e 3 ml de corante alimentício azul foi homogeneizada em um processador de alimentos (Mondial 435W com emulsificador) durante 3 minutos. Em seguida foi adicionada uma parte de solução de citrato de cálcio (20%) (4,21 ml) para 19 partes da mistura M1 (80 ml), e mantidas em rotação por mais dois minutos, originando a mistura M2. A separação das microcápsulas ocorreu com a adição de seis partes de óleo de soja (480 ml) para uma parte da mistura M2 (80 ml) sob uma rotação contínua de 15 minutos (ensaio 1) e de 10 minutos (ensaio 2). Cada ensaio foi realizado em ocasiões distintas. Após a rotação de 10 ou 15 minutos, foi adicionada a mistura M2, uma solução contendo 2 ml de ácido acético em 30 ml de óleo de soja, a qual foi rotacionada por mais cinco minutos, até a adição de uma solução de 480 ml de CaCl_2 50 mM para promover a gelificação das microcápsulas. Após a adição do CaCl_2 , toda a mistura foi então rotacionada por mais 20 segundos. Ao cessar a rotação as microcápsulas foram decantadas durante 60

minutos (Figura 5) e em seguida retiradas e lavadas com uma solução de 600 ml de Tween 20 (1%) e 1800 ml de água destilada. As microcápsulas foram separadas por meio de peneiramento nas seguintes malhas: 20 e 450 μm (Figura 6), sendo que as microcápsulas retidas entre o intervalo dessas duas malhas foram utilizadas no presente trabalho. O tamanho da malha de 450 μm foi escolhido com base no tamanho médio da fase instar I da *Artemia* salina (Stappen, 1996). Foi descartado o produto que passou pela malha de 20 μm e o que foi retido pela malha de 450 μm .



Figura 5. Processador de alimentos, ao final do preparo. A camada mais clara, é o óleo, a segunda, a água e no fundo, as partículas formadas. Fonte: Autor, 2013.



Figura 6. A - microencapsulado utilizado; B – produto descartado. Fonte: Autor, 2013.

3.3 ANÁLISE FÍSICA DAS MICROCÁPSULAS

Para a análise das microcápsulas foi realizada a diluição das mesmas na razão de 1:60 em água destilada, totalizando 30 ml de amostra diluída, da qual 50 µl por vez foram utilizados para a confecção de lâminas a fim de obter-se imagens no microscópio Leica com aumento de 40x, acoplado a um computador com o software LAZ EZ 3.00 para a captura das imagens.

Todas as imagens foram transformadas para o formato oito bits e coloração preto e branco no programa computacional ImageJ 1.47. Essas imagens em seguida foram analisadas em conjunto com as imagens originais no programa computacional GIMP 2.8, com o intuito de apagar de forma manual as esferas que estavam em contato umas com as outras. Com a observação comparativa entre as imagens editadas e as imagens originais, foram identificadas quais microcápsulas apresentavam o contato com outras (Figura 7)

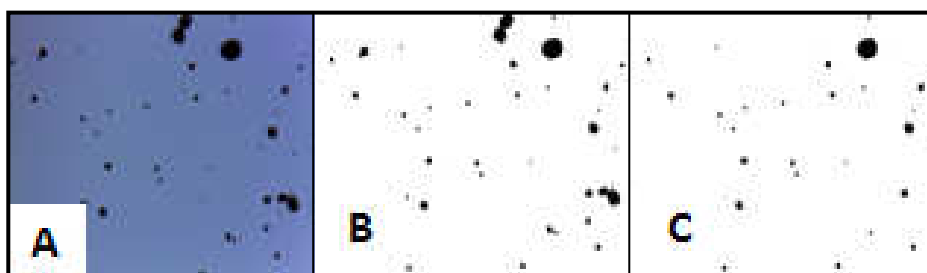


Figura 7. Imagem dos microencapsulados tratadas. A – imagem original; B – aplicação de oito bits e preto e branco no Image J; C – esferas que estavam juntas foram apagadas no programa GIMP. Fonte: Autor, 2013.

Após a retirada das microcápsulas em contato, as imagens foram analisadas pela ferramenta “Analyze Particles” do programa computacional ImageJ 1.47, a qual foi utilizada para o cálculo dos seguintes parâmetros físicos das microcápsulas: área (μm^2) e esfericidade (diâmetro do eixo maior/diâmetro do eixo menor). A esfericidade varia entre os valores 0,0 a 1,0, sendo que o valor de 1,0 é obtido quando a imagem apresenta uma esfera perfeita (SANTOS, 2012). Foram analisadas imagens de 1000 microencapsulados de cada ensaio.

Os dados de área e esfericidade foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0,05$). Foram realizadas as distribuições de frequência para os valores de área de cada ensaio. Para os dados de área e esfericidade também foram calculados os valores mínimos e máximos, média, desvio padrão, moda, mediana e coeficiente de variação (%). A diferença estatística entre as médias dos valores de área e esfericidade dos

dois ensaios foram testados pelo teste de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). Para cada ensaio também foi realizada uma análise de dispersão dos dados entre a área e a esfericidade das microcápsulas. As análises estatísticas foram implementadas por meio dos programas computacionais Statistica 7.0 e Assistat 7.6b.

3.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MICROENCAPSULADO EM ÁGUA

Com o objetivo de avaliar a estabilidade dos microencapsulados na água, foi realizado um experimento com delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e quatro repetições. Como unidades experimentais foram utilizados potes plásticos com capacidade de 500 ml cobertos com filme plástico e aeração constante. Cada tratamento recebeu 400 ml de água destilada. O tratamento 1 (MC) recebeu 5g de microencapsulado do ensaio 1 por unidade experimental. O tratamento 2 (CO) foi considerado o controle e não recebeu microencapsulado. Diariamente durante cinco dias os seguintes parâmetros de qualidade de água foram medidos: pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e oxigênio dissolvido (mg/L). Para a mensuração foi utilizado um multipâmetro YSI.

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, amostras dos microencapsulados foram retiradas no primeiro, terceiro e quinto dia de experimento para observação do aspecto das microcápsulas em microscópio e lupa.

Os dados dos parâmetros da qualidade da água foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0,05$). As diferenças entre as médias de cada parâmetro foram testadas com os testes t ou Mann Whitney, de acordo com a normalidade dos dados. As análises estatísticas foram implementadas por meio dos programas computacionais Statistica 7.0 e Assistat 7.6b. Para avaliar a relação entre o tempo do experimento e os valores de condutividade, os mesmos foram submetidos a análise de regressão linear ($\alpha=0,05$).

3.5 TESTE DE ACEITABILIDADE DAS MICROCÁPSULAS PELAS LARVAS

Para observar a aceitabilidade do microencapsulado pelas larvas, foi realizado um teste no qual as microcápsulas do ensaio 1 foram oferecidas à cinco larvas de suruvi

Steindachneridion scriptum. A aceitabilidade foi verificada pela presença do microencapsulado no trato digestivo de cada larva após cinco minutos da alimentação. A presença das microcápsulas no trato digestivo de cada larva foi confirmada pela coloração azul do mesmo.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE FÍSICA DAS MICROCÁPSULAS

Os dados de área e esfericidade das microcápsulas para os dois ensaios não apresentaram uma distribuição normal ($p < 0,05$).

A distribuição de frequência da área das microcápsulas para os ensaios 1 e 2 são apresentados na figura 8. A distribuição de frequência comparativa de ambos os ensaios sugeriu que o ensaio 1 produziu microcápsulas de menor área quando comparada ao ensaio 2. O teste de Mann Whitney indicou que existe diferença significativa entre as médias das áreas das microcápsulas dos ensaios 1 e 2 ($p < 0,05$).

Os resultados dos valores mínimos e máximos, média, desvio padrão, moda, mediana e coeficiente de variação da área e esfericidade das microcápsulas para cada ensaio, podem ser observados na tabela 1.

A relação entre área e esfericidade podem ser observadas nas figuras 9 e 10 para o ensaio 1 e 2, respectivamente. A comparação entre os dois gráficos de dispersão sugeriu que além do ensaio 1 ter produzido microcápsulas menores, as mesmas se revelaram mais esféricas em relação às produzidas no ensaio 2. Essa constatação foi confirmada pelo resultado do teste de Mann Whitney para a esfericidade, o qual indicou diferença significativa entre as médias dos ensaios 1 e 2 ($p < 0,05$).

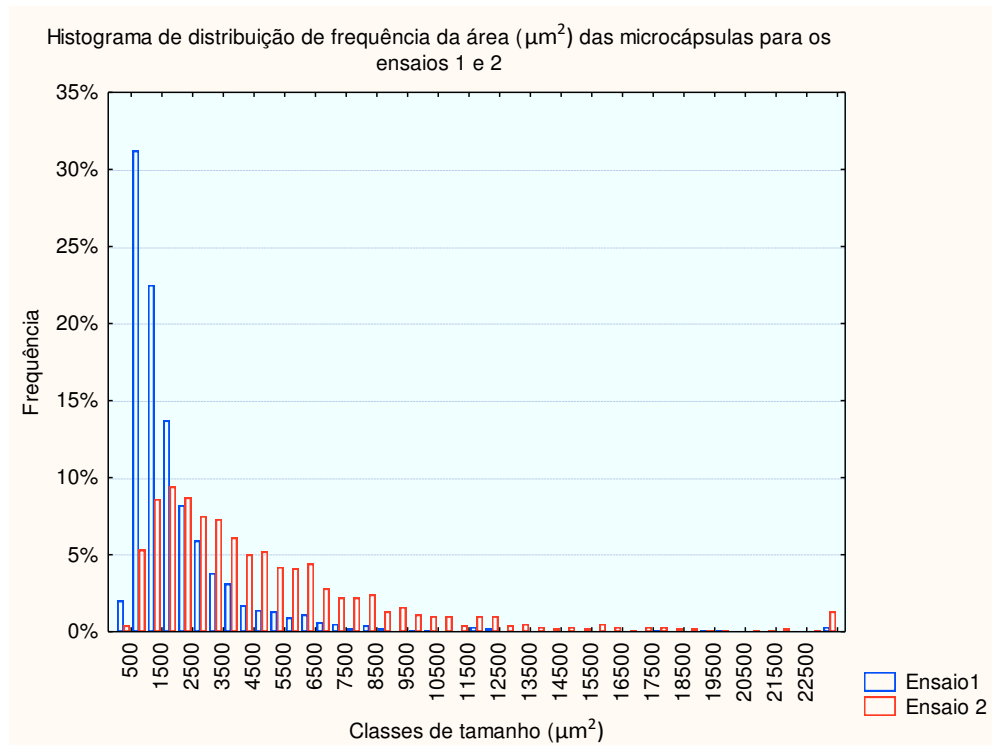


Figura 8. Distribuição de frequência da área das microcápsulas para o ensaio 1 e 2.

Tabela 1. Valores mínimos e máximos, média, desvio padrão, moda, mediana e coeficiente de variação da área e esfericidade das microcápsulas para os ensaios 1 e 2.

Ensaio	Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Mediana	Coeficiente de variação (%)	Moda
1	Área (μm^2)	327,538	34635,928	2035,726	2430,161	1380,700	119,375	745,780/844,041/1116,150
2	Área (μm^2)	420,761	42189,468	5059,778	4693,907	3702,444	92,769	1027,967/1186,697/1461,325/1753,590/2015,621/2018,141/2504,409
1	Esfericidade(μm)	1,003	1,881	1,133	0,104	1,105	9,211	1,076/1,083
2	Esfericidade(μm)	1,007	2,977	1,406	0,299	1,325	21,306	1,085/1,149/1,194

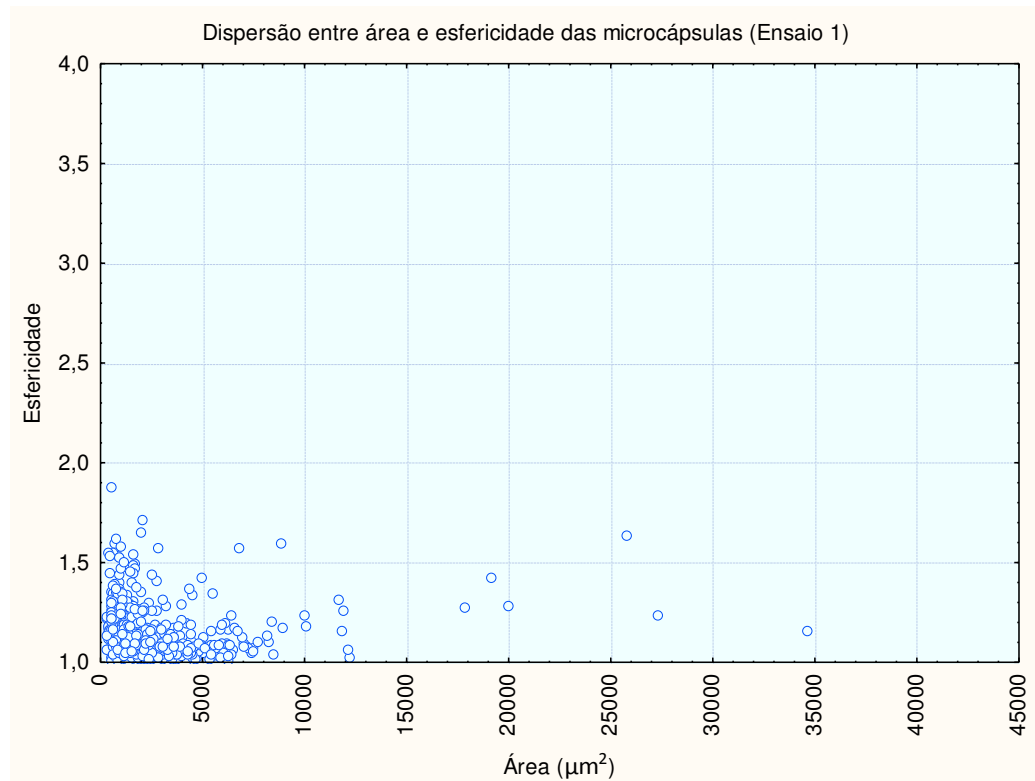


Figura 9. Dispersão entre área e Esfericidade das microcápsulas do Ensaio 1.

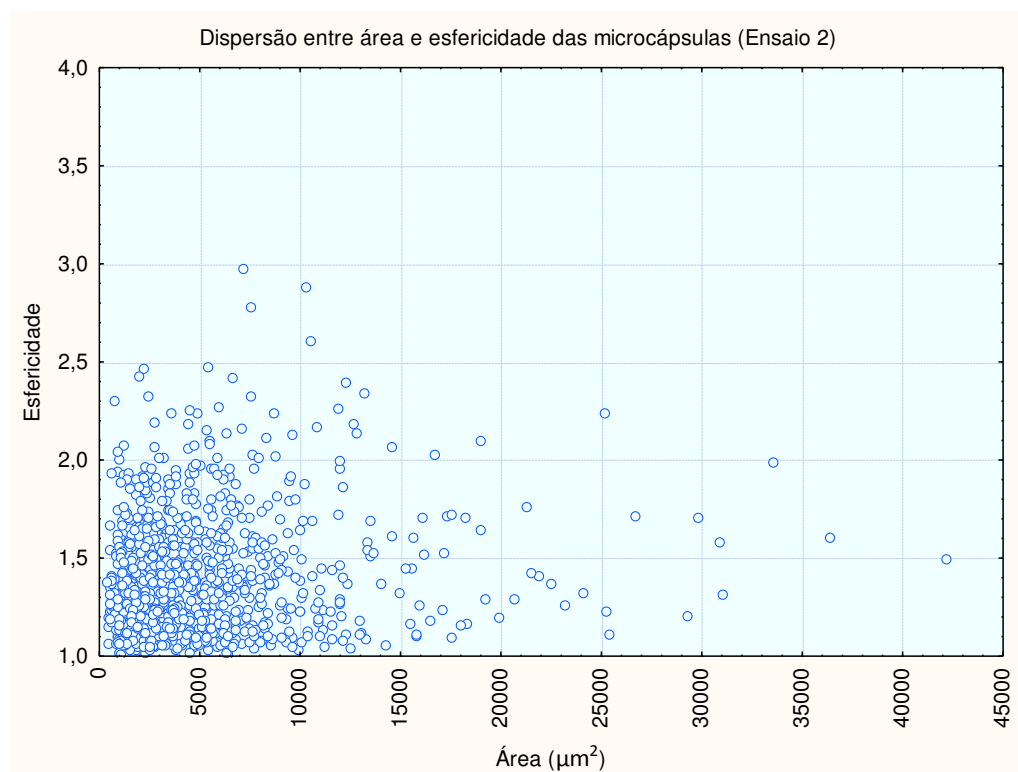


Figura 10. Dispersão entre área e Esfericidade das microcápsulas do Ensaio 2.

4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MICROENCAPSULADO EM ÁGUA

Os dados de condutividade, temperatura e pH dos tratamentos apresentaram uma distribuição normal ($p < 0,05$). Os dados de oxigênio dissolvido não apresentaram uma distribuição normal ($p < 0,05$).

As médias e seus respectivos erros padrões, para cada parâmetro em cada tratamento são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Médias e respectivos erro padrões para condutividade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido dos dois tratamentos.

Tratamento	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) \pm e.p.	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) \pm e.p.	pH \pm e.p.	Oxigênio Dissolvido (mg/L) \pm e.p.
CO	$0,009 \pm 0,000544$	$23,135 \pm 0,257472$	$7,259 \pm 0,344304$	$8,446 \pm 0,067931$
MC	$0,032 \pm 0,003367$	$23,200 \pm 0,187972$	$7,135 \pm 0,362810$	$8,232 \pm 0,159757$

A diferença entre as médias dos tratamentos só foi significativa para o parâmetro condutividade ($p < 0,05$). Os resultados das regressões lineares entre o tempo em dias e os valores de condutividade foram significativos para ambos os tratamentos ($p < 0,05$). As equações da reta e seus respectivos valores de R são apresentados na figura 11.

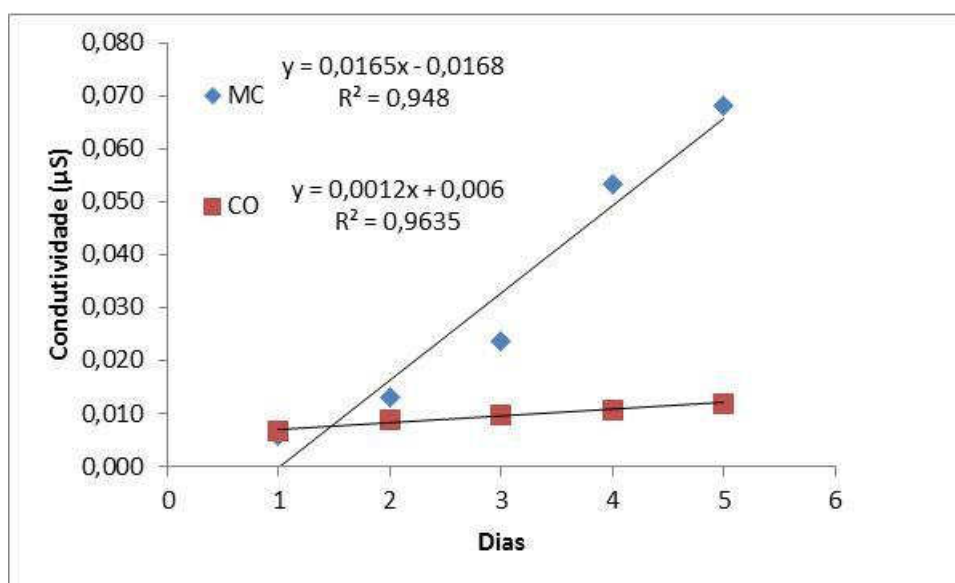


Figura 11. Regressões lineares entre os dias de experimento e os valores de condutividade para ambos os tratamentos.

A análise de regressão permitiu inferir que ocorreu uma tendência ao aumento mais pronunciado dos valores de condutividade da água do tratamento MC em relação ao tratamento CO, ao longo do tempo. A figura 12 apresenta o aspecto da degradação das microcápsulas no tratamento MC ao longo do tempo, o que corrobora os respectivos valores de condutividade.

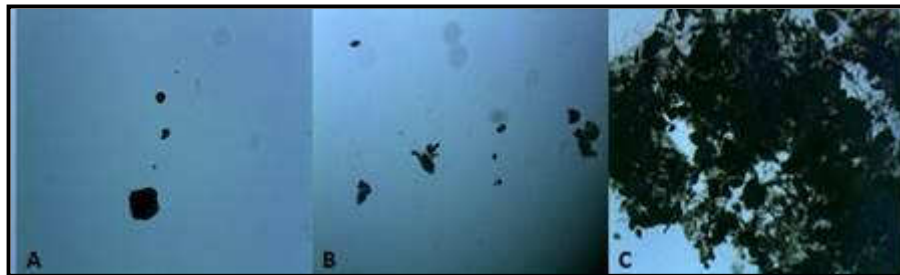


Figura 12. Aspecto das microcápsulas ao longo do experimento. A, B e C correspondem ao primeiro, terceiro e último dia de experimento respectivamente. Fonte: Autor, 2013

4.3 TESTE DE ACEITABILIDADE DAS MICROCÁPSULAS PELAS LARVAS

Todas as larvas submetidas ao teste de aceitabilidade ingeriram as microcápsulas. As mesmas apresentam coloração azul do trato digestivo (Figura 13).

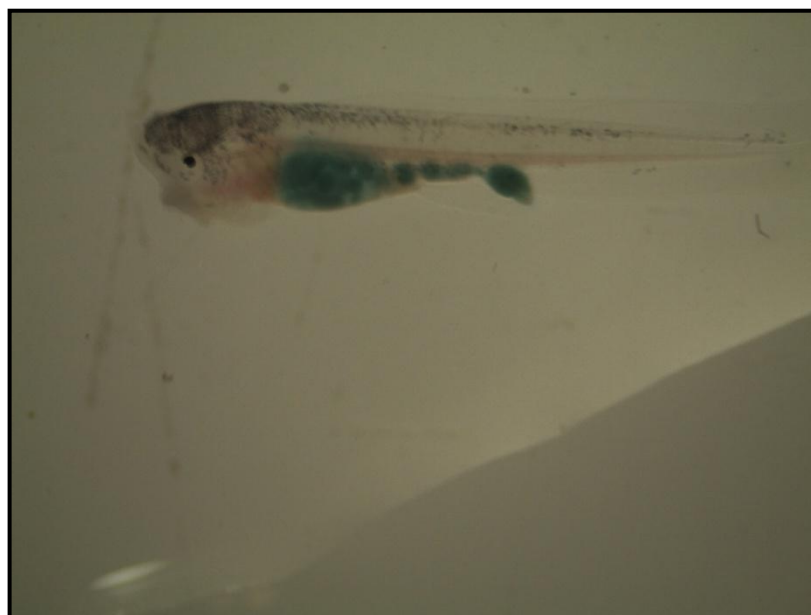


Figura 13. Larva de suruvi, com o trato digestivo apresentando as microcápsulas.

5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE FÍSICA DAS MICROCÁPSULAS

O tamanho das partículas depende principalmente de alguns fatores como: tipo de equipamento utilizado para rotacionar o preparado; velocidade e tempo de rotação; tipo e concentração do alginato; e concentração do surfactante (MOFIDI, 1999). Nesse estudo, iremos comparar apenas o tempo de rotação com as características físicas das microcápsulas.

Pôde-se constatar que um maior número de microcápsulas com esfericidade próxima a um foram encontradas no ensaio 1 ($1,133 \pm 0,104$). Enquanto no ensaio 2, formaram-se microcápsulas com valores de esfericidade um pouco mais elevados ($1,406 \pm 0,299$). Santos (2012) encontrou com a mesma concentração de alginato aqui utilizada, valores de esfericidade de $1,17 \pm 0,16$. Em nenhum ensaio foi possível obter partículas perfeitamente esféricas, pois todos os valores de esfericidade foram superiores a um.

Rodrigues (2006), em trabalho publicado, testou diferentes concentrações de alginato e obteve diâmetros que variaram em torno de $180,9 \pm 21,3 \mu\text{m}$ para uma rotação de 2000 rpm, com alginato a 2%. Calculando a área dessas partículas – aproximadamente $25702 \mu\text{m}^2$ – observamos que foram poucas as que alcançaram uma área próxima a essa em ambos os ensaios no presente trabalho. É esperado que menores concentrações de alginato, proporcionem menores tamanhos de microcápsulas (LEMOINE, 1998).

Yúfera (2005), em trabalho realizado com tempo de rotação igual a 10 minutos, separou as diferentes microcápsulas por tamanho: $< 200 \mu\text{m}$, $200\text{-}400 \mu\text{m}$ e $>400 \mu\text{m}$. Encontrando tamanhos de diâmetros de $199 \mu\text{m} \pm 66$, $312 \mu\text{m} \pm 145$, $526 \mu\text{m} \pm 243$, respectivamente. Calculando as áreas a partir desses diâmetros – $31102,55 \mu\text{m}^2$; $76453,79 \mu\text{m}^2$; $217309,82 \mu\text{m}^2$ – constataremos que as áreas da maioria das esferas, neste presente trabalho, foram inferiores às encontradas no trabalho de Yúfera (2005).

Ter obtido uma maior quantidade de partículas menores no ensaio 1 já era esperado e está relacionado ao tempo de rotação. Para Yúfera (2005), um maior tempo de rotação irá resultar em partículas ainda menores. Portanto, ajustando uma adequada velocidade e malhas adequadas para separação das partículas, é possível selecionar os tamanhos desejados para a oferta em determinada fase de desenvolvimento larval.

Através dessa técnica pode ser viável fornecer probióticos e antibióticos para larvas. Na literatura consta que o alginato induz a resposta imune no sistema de peixes e já existem testes para avaliar o uso da técnica para o fornecimento de fármacos. Além disso, avaliar a possibilidade de colocar dentro dessas cápsulas enzimas que ajudem na digestão do alimento, no sistema ainda rudimentar de larvas, e hormônios para reversão sexual, podem contribuir em muito para a aquicultura e reafirmam o potencial do uso do alginato para a formação de microcápsulas para seus diversos fins.

5.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MICROENCAPSULADO EM ÁGUA

Segundo Yúfera (2005), o gel formado entre a reação alginato-cálcio é um material poroso e por isso não é possível evitar a degradação por microorganismos. Ocorreu um aumento progressivo dos valores de condutividade a medida que as microcápsulas se degradavam dentro das unidades experimentais.

A resposta dos peixes às variações de pH da água, é bastante importante, uma vez que os animais estão submetidos a elas, em função do manejo utilizado e da dinâmica ambiental, durante as diversas fases de seu desenvolvimento (FERREIRA, 2001). Os valores de pH, mantiveram-se entre a escala de neutro e alcalino. Valores de pH neutro e ligeiramente alcalino têm sido recomendados por alguns autores, como sendo apropriados para o cultivo de espécies comerciais de água doce (BOYD, 1982 apud REYNALTE, 2000). A presença das microcápsulas também não alterou os valores de temperatura e o oxigênio dissolvido, sendo os mesmos adequados para larvas.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que através de uma metodologia simples é possível produzir microcápsulas de tamanho desejado para o fornecimento como primeiro alimento para larvas de surubi. Melhorias no crescimento e sobrevivência de larvas dependem do avanço dos conhecimentos sobre as necessidades nutricionais destes organismos. A técnica de microencapsulação testada se mostrou eficiente e pode ser utilizada para distintas dietas. A

baixa toxicidade do alginato e imunogenicidade, citadas na literatura, tornam este polímero uma matriz bastante segura para o uso em aquicultura. A possibilidade de microencapsular dietas formuladas e outros compostos, reafirma o potencial de uso da molécula na larvicultura de peixes.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMANTE, W.B., WEINGARTNER, M., NUÑER, A. P. O. **Feed transition in larval rearing of bocudo, *Steindachneridion scripta* (Pisces, Pimelodidae), using *Artemia* spp. Nauplii and artificial diet.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.5, p.1294-1300, 2007.

BRESSEL, T. A. B. **Sistema gerador de microcápsulas de alginato** [Tese de Doutorado] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética e Biologia Molecular; 2007.

CAVALCANTE, D. P. **Criação de peixes nativos em tanque-rede: influência sobre a qualidade de água sobre as populações planctônicas do reservatório da usina hidrelétrica de Itá** [Tese de Doutorado] Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, 2010.

DIEMER, O.; NEU, D. H.; SARY, C.; FINKLER, J. K.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. ***Artemia* sp. na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*).** Ciência Animal Brasileira, Goiânia, v.13, n.2, p. 175-179, abr./jun. 2012

EPAGRI. **Planilha com dados estatísticos da piscicultura por espécie 2012.** Disponível em:
<http://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=140&Itemid=173>. Acesso em 7 de novembro de 2013.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Roma, 2012.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Perspectivas para la producción de algas marinas en los países em desarrollo.** 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/004/Y3550S/Y3550S00.HTM>>. Acesso em: 5 de novembro de 2013.

FERREIRA, A. A., NUÑER, A. P. de O., ESQUIVIEL, J. R. **Influência do pH sobre ovos e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Osteichthyes, Siluriformes).** Acta Scientiarum, v.23, n. 2, p. 477-481, Maringá, 2001

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação de peixes.** Piracicaba: Ed. Franciscana, Brasil. 1997.

LEMOINE, D.; WAUTERS, F.; BOUCHEND'HOMME, S.; PRÉAT, V. **Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen** International Journal of Pharmaceutics v. 176 p. 9-19, 1998.

LUZ, R. K.; ZANIBONI FILHO, E. **Utilização de diferentes dietas na primeira alimentação do mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*, Lacépède).** Acta Scientiarum, v.23, n. 2, p. 483-489, 2001.

MENOSSE, O. C. C.; TAKATA, R.; SÁNCHEZ-AMAYA, M. I.; FREITAS, M.; YÚFERA, M.; PORTELLA, M. C. **Crescimento e estruturas do sistema digestório de larvas de pacu alimentadas com dieta microencapsulada produzida experimentalmente.** R. Bras. Zootec., v.41, n.1, p.1-10, 2012)

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). Aquicultura. **Geração de Emprego e Renda** 2011. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/emprego-e-renda> >. Acesso em: 25 de Setembro de 2013.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). **Boletim da Pesca e Aquicultura.** Brasil, 2013.

MOFIDI, N.; AGHAI-MOGHADAM, M.; SARBOLOUKI, M. N.; **Mass preparation and characterization of alginate microspheres.** Process Biochemistry, v.35, p. 885-888, 1999.

PONCELET, D.; LENCKI, R.; BEAULIEU, C.; HALLE, J.P.; NEUFELD, R.J.; FOURNIER, A., 1992. **Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I: methodology.** Appl. Microbiol. Biotechnol.38, 39– 45.

PORTELLA, M. C.; DABROWSKI, K. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae. In: CYRINO, J. E. C.; KAPOOR, B. G. (Orgs.). **Feeding and digestive functions of fishes.** Enfield: Science Publishers, 2008. P. 227-279.

REYNALTE, D. A. T., ZANIBONI FILHO, E. **Efeito do pH da água na incubação e larvicultura do curimatá *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1847 (Characiformes, Prochilodontidae).** [Dissertação de Mestrado] Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias; 2000.

RODRIGUES, A. P., DANIELA HIRSCH, H.C.P., FIGUEIREDO, P.V.R, LOGSTO, Â. M. **Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination.** Process Biochemistry v. 41, p. 638-643, 2006.

SANTOS, R. S. B. **Estudo dos fatores que influenciam os atributos de esferas de alginato.** [Dissertação de Mestrado] Aveiro: Universidade de Aveiro, Departamento de Química; 2012.

SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., VEIGA, F., **Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação.** Rev. Bras. Cienc. Farm. vol.39 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2003

STAPPEN, V. **Artemia: Use of cysts.** In Lavens, P.; Sorgeloos P, (editores). Manual on the production and use of life food for the aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 361. Rome, FAO. 1996.

URBANO, A. P. A. **Microencapsulação de fármacos peptídicos em pectina pelo método de emulsificação/gelificação interna: A albumina como fármaco modelo.** [Dissertação de Mestrado] Coimbra: Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia; 2004.

YÚFERA, M. ; FERNÁNDEZ-DÍAS, C.; PASCUAL, E. **Food microparticules for larval fish prepared by internal gelation.** Aquaculture, v. 248, p. 253-262, 2005